

機関番号：12601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21790970

研究課題名（和文）網羅的手法を用いた先天性奇形症候群の病態解明とその臨床応用

研究課題名（英文）Genome-wide analysis of pathogenesis of congenital anomaly syndromes and clinical applications

研究代表者

本村 あい（MOTOMURA AI）

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：40511465

研究成果の概要（和文）：先天性奇形症候群(CAS)はしばしば悪性腫瘍を合併するが、その分子病態は十分解明されていない。そこで、肝芽腫を合併した Sotos 症候群、網膜芽腫を合併した有馬症候群および卵巣がんを合併した Noonan 症候群の患者検体より抽出した DNA を用いて SNP アレイによる網羅的ゲノム解析を行った。その結果、既知のゲノム異常に加えて、新たなゲノムの増幅、欠失が複数検出され、これらの領域に存在する遺伝子の量的あるいは質的異常が CAS および悪性腫瘍の合併に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Although congenital anomaly syndromes (CAS) often complicate malignant tumors, pathogenesis of CAS and these tumors are not fully understood. Thus, to investigate molecular pathogenesis of CAS and complicated tumors, we performed genome-wide copy number analysis of hepatoblastoma in Sotos syndrome, retinoblastoma in Arima syndrome and ovarian cancer in Noonan syndrome using SNP-genotype microarrays. Several unknown copy number changes including high-grade amplification of 2q24, gain of chromosome 2 and uniparental disomy of 18p were identified in these tumors. Our results suggest that candidate target genes involved in the pathogenesis of complicated tumors would be exist within the regions showing copy number abnormalities.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：先天性奇形症候群・Noonan 症候群・結節性硬化症・SNP array・卵巣がん・Sotos 症候群・肝芽腫

1. 研究開始当初の背景

先天性奇形症候群の成因は単一遺伝子、多因子遺伝子、染色体異常、催奇形因子および感染などさまざまであるが、最も頻度の高いものは loss of heterozygosity (LOH)、片親

性ダイソミー(UPD)などのアレル不均衡および点突然変異によりもたらせられるゲノム異常と推定されている。しかし現在のところ、先天性奇形症候群の約 70%が原因不明であり、症状に対応する特異的なゲノム異常は同定

されていない。一方、ゲノム異常に起因して先天性奇形症候群ではしばしば悪性腫瘍を合併するために、正確なゲノム異常の解析は患児の自然史を予測し、健康管理を行う上でも重要と考えられる。また先天性奇形症候群に合併する悪性腫瘍の分子病態を解明することは、治療の標的となる標的分子の同定に寄与し、予後の改善に貢献することが予測される。

2. 研究の目的

悪性腫瘍などの合併により治療が必要な先天奇形を有している小児は毎年、全出生児の約3%を占める。しかし、先天性奇形症候群に合併する悪性腫瘍の分子病態は十分解明されていない。そこで、本申請ではこれまで原因不明であった先天性奇形症候群の診断システムの構築とその病態解明および合併する悪性腫瘍の発症分子機構の解明を目指して、最新のアレイ技術を駆使した先天性奇形症候群の網羅的ゲノム解析を展開する。

3. 研究の方法

1. Affymetrix 社 250K/500K GeneChip microarray を用いたゲノム異常の網羅的探索：

検体としては、肝芽腫を合併した Sotos 症候群、網膜芽腫を合併した有馬症候群および卵巣がんを合併した Noonan 症候群の患者検体より抽出した DNA を用いた。これらは東京大学医学部小児科および関連施設のデータベース中で十分な臨床記録が得られる検体である。腫瘍試料から抽出したゲノム DNA を適切な制限酵素で消化し、断端に共通のアダプターを付加した後、PCR により増幅する。PCR 産物の精製後に DNaseI 処理によりさらに断片化し、biotin ラベルをした後、GenChip 50K/250K アレイ上でハイブリダイゼーションを行う。我々が開発した CNAG/AsCNAR アルゴリズムを用いてデータを分析し、平均解像度 24kb~6kb でゲノム全域にわたる網羅的なゲノムコピー数の解析を行った。

2. 標的遺伝子の同定と遺伝子性状の解析：

解析した腫瘍におけるゲノムコピー数の変化のうちホモ欠失、LOH、UPD、gain および amplification の共通領域内に存在する遺伝子(群)につき、FISH 解析、real-time PCR 解析を行った。また Heteroduplex mobility assay 法、直接塩基配列決定法による変異解

析により、腫瘍化との関連性のさらなる検証を行った。さらに培養細胞とヌードマウスを用いて、標的遺伝子の性状解析を試みた。

(倫理面への配慮)

本研究で行った臨床検体を用いた実験は、東京大学の倫理審査委員会で審査され、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針(2003年3月)」を遵守することを条件に承認された。検体提供者への人権擁護、個人情報保護に細心の注意を払って本研究を実施した。

4. 研究成果

1) 先天性奇形症候群に合併した腫瘍におけるゲノムコピー数の異常

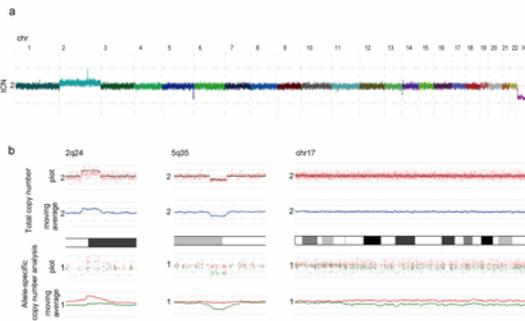
Sotos 症候群の原因としてはこれまで 5q35 に存在する *MSDI* 遺伝子の機能喪失が報告されている。本症は他の過成長症候群と同様に白血病や神経芽腫など悪性腫瘍を合併することが報告されているが、肝芽腫の合併の報告はこれまでにない。本症例においても *MSDI* を含む 5q35 領域のヘミ欠失が確認され、これに加えて 2 番染色体の増幅および 2q24 領域の高度増幅、18 番染色体長腕の片親性ダイソミーが腫瘍ゲノムに検出された(図 1)。従って、これらのゲノム異常がみられた領域には肝芽腫の発症に関与する遺伝子が存在する可能性が示唆された。

また有馬症候群の解析では *RB* 遺伝子を含む 13q 領域内に約 2MB のヘテロ欠失を見出した。本症例は生後 1 年で網膜芽腫を発症したため、この症例の正常検体および腫瘍検体の解析を行ったところ、全体として 13q の欠失以外は明らかなゲノムコピー数の異常は見出されなかった。また腫瘍検体を用いて *RB* 遺伝子の変異解析を行ったところ、exon29 にナンセンス変異を検出した。検出した 13q の欠失は germlin 変異であったことから、13q の欠失領域内には小脳低形成、精神運動発達遅滞など有馬症候群の表現型を決定する遺伝子が存在する可能性が示唆された。

Noonan 症候群には若年性骨髄単球性白血病、神経芽腫など悪性腫瘍をしばしば合併することが知られているが、卵巣がんを合併した報告はこれまでにない。そこで、卵巣がんを合併した Noonan 症候群に関しては患者由来の正常検体および腫瘍検体につき、SNP アレイにより詳細にゲノムコピー数の解析を

行った。しかし、正常検体、腫瘍検体ともに大きな領域のゲノムコピー数の異常は検出されなかった。従って、本症例の腫瘍化のメカニズムとしては、Noonan 症候群の発症に関与する RAS 経路の異常に加えて、特定の遺伝子の微細な欠失、増幅もしくは変異が関与している可能性が示唆された。

図 1 Sotos 症候群に合併した肝芽腫のゲノム異常



図の説明

全染色体のゲノムコピー数の変化。SNP アレイの特性を生かして、アレル別の変化も検出可能である。Sotos 症候群の原因遺伝子が存在する 5q35 の欠失以外にも複数の異常を検出した。

2)まとめと考察

Sotos 症候群や Noonan 症候群に白血病や神経芽腫などの悪性腫瘍が合併することが知られているが Sotos 症候群における肝芽腫の合併や Noonan 症候群における卵巣がんの合併は極めて稀である。また有馬症候群は極めて稀な小脳低形成、精神運動発達遅滞などを合併する先天性奇形症候群であるが、悪性腫瘍の合併はこれまで報告がない。これらの貴重な症例の詳細なゲノム解析により、既知のゲノム異常に加えて、新たなゲノムの増幅、欠失が複数検出された。従って、これらの領域に存在する遺伝子の量的あるいは質的異常が先天性奇形症候群および悪性腫瘍の合併に関与している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

1. 本村あい, 大久保淳, 滝田順子, 井田孔明, 菊地陽, 五十嵐隆「臍帯血移植

後に再発した MLL 遺伝子再構成陽性乳児 ALL の 3 例」日本小児科学会雑誌 2010 年 2 月 114 巻 2 号 Page297 査読有

2. Takita J, Motomura A, Ko K, Ida K, Taki T, Hayashi Y, Igarashi T: Acute megakaryoblastic leukemia in a child with the MLL-AF4 fusion gene. Eur J Haematol. 83:149-153, 2009, 査読有

3. 本村あい, 滝田順子, 他 5 名「治療中再発を来たした細胞表面免疫グロブリン陰性成熟 B 細胞型急性リンパ性白血病の乳児例」小児がん 2009 年 11 月 46 巻プログラム・総会号 Page447 査読有

4. 本村あい, 滝田順子, 他 9 名「小児固形腫瘍における ALK 阻害剤の感受性 (Effects of selective ALK inhibitor to pediatric solid tumors) (英語)」日本癌学会総会記事 68 回 2009 年 8 月 Page483 査読有

5. 本村あい, 滝田順子, 他 6 名「周期的な血小板減少を認める 6 歳男児」日本小児科学会雑誌 2009 年 2 月 113 巻 2 号 Page432 査読有

6. 本村あい, 小田洋一郎, 他 5 名 「急性胃腸炎に続発した十二指腸潰瘍出血により急激な貧血を呈した 1 歳男児例」神奈川医学会雑誌 2009 年 1 月 36 巻 1 号 Page51 査読有

[学会発表] (計 16 件)

1. 本村あい, 滝田順子, 樋渡光輝, 井田孔明, 五十嵐隆: 同種造血幹細胞移植後に晩期発症非感染性肺合併症を来たした 3 例. 第 52 回日本小児血液学会総会, 大阪, 2010 年 12 月 17 日~19 日

2. 樋渡光輝, 本村あい, 滝田順子, 井田孔明, 五十嵐隆: 臍帯血移植後に特発性血小板減少性紫斑病を発症した 2 例. 第 52 回日本小児血液学会総会, 大阪, 2010 年 12 月 17 日~19 日

3. 高橋正貴, 金森豊, 鈴木完, 小高哲郎, 寺脇幹, 古村眞, 杉山正彦, 本村あい, 滝田順子, 井田孔明, 岩中督: 小児卵黄嚢腫瘍の微小再発巣や遠隔転移巣検出における FDG-PET の有用性. 第 26 回日本小児がん学会学術集会, 大阪, 2010 年 12 月 17 日~19 日

4. 中釜悠, 本村あい, 滝田順子, 樋渡光輝, 井田孔明, 菊地陽, 五十嵐隆: 治療不応

性の経過をたどる神経芽腫stage 4の9歳男児例. 第26回日本小児がん学会学術集会, 大阪, 2010年12月17日~19日

5. 古村眞, 鈴木完, 小高哲郎, 寺脇幹, 杉山正彦, 金森豊, 岩中督, 本村あい, 滝田順子, 井田孔明: 腫瘍破裂によるショック状態で緊急開腹手術施行した左副腎原発神経芽腫の一例. 第26回日本小児がん学会学術集会, 大阪, 2010年12月17日~19日
6. 川上亜希, 本村あい, 滝田順子, 樋渡光輝, 井田孔明, 菊地陽, 五十嵐隆: 寛解導入療法中に右心室に巨大血栓を形成したT細胞性急性リンパ性白血病の15歳男児. 第52回日本小児血液学会総会, 大阪, 2010年12月17日~19日
7. 益田大幸, 樋渡光輝, 本村あい, 磯島豪, 榎田紀子, 滝田順子, 井田孔明, 北中幸子, 五十嵐隆: 臍帯血移植後に甲状腺中毒症を合併した急性骨髄性白血病の1例. 第52回日本小児血液学会総会, 大阪, 2010年12月17日~19日
8. 村山智紀, 小林宏彰, 土屋武弘, 日野春秋, 長山和弘, 村川知弘, 中島淳, 森岡まさき, 中釜悠, 本村あい, 滝田順子: 急性リンパ性白血病の加療中に肺動脈塞栓症, 肺アスペルギローマを合併し1期的に切除しえた1例. 第154回日本胸部外科学会関東甲信越地方会, 東京, 2010年11月13日
9. 本村あい, 大久保淳, 滝田順子, 井田孔明, 菊地陽, 五十嵐隆: 臍帯血移植後に再発したMLL遺伝子再構成陽性乳児ALLの3例. 第113回日本小児科学会学術集会, 岩手, 2010年4月23日~25日
10. 笹野明子, 井田孔明, 本村あい, 大久保淳, 滝田順子, 菊地陽, 五十嵐隆, 寺島宙, 横山美貴, 林良樹: 生後3ヵ月で急性巨核芽球性白血病を発症したダウン症候群の1例. 第113回日本小児科学会学術集会, 岩手, 2010年4月23日~25日
11. Motomura A, Takita J, Nishimura R, Ohki K, Ohkubo J, Ida K, Kikuchi A, Okita H, Ogawa S, Igarashi T: Refractory Ewing Sarcoma family of tumors in a child with EWS-FEV fusion gene. The 6th Congress of Asian Society for Pediatric Research & 51st

Annual Meeting of Taiwan Pediatric Association, Taipei, Taiwan, April 15~18, 2010

12. 本村あい, 滝田順子, 井上毅信, 小川敦, 康勝好, 井田孔明, 五十嵐隆, 崎山弘: 周期的な血小板減少を認める6歳男児. 第112回日本小児科学会学術集会, 奈良, 2009年4月17日~19日
13. 井上毅信, 小川敦, 本村あい, 滝田順子, 康勝好, 井田孔明, 五十嵐隆: 周期的な血小板減少を認める6歳男児. 第112回日本小児科学会学術集会, 奈良, 2009年4月17日~19日
14. 塩崎純子, 康勝好, 本村あい, 滝田順子, 井田孔明, 三浦健一郎, 関根孝司, 五十嵐隆: 初発時に著明な高カルシウム血症を認めた急性リンパ性白血病の一例. 第112回日本小児科学会学術集会, 奈良, 2009年4月17日~19日
15. 本村あい, 滝田順子, 大木健太郎, 西村力, 加藤元博, 陳玉彦, 真田昌, 菊地陽, 五十嵐隆, 林康秀, 小川誠司: 小児固形腫瘍におけるALK阻害剤の感受性. 第68回日本癌学会学術総会, 横浜, 2009年10月1日~3日
16. 大久保淳, 井田孔明, 本村あい, 康勝好, 滝田順子, 菊地陽: 臍帯血移植後の生着不全と血球貧食症候群の関連について. 第51回日本小児血液学会, 千葉, 2009年11月27日~29日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

本村 あい (MOTOMURA AI)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号: 40511465